

**TUGAS GENETIKA MOLEKULER**

**MACAM-MACAM TIPE PCR  
DAN  
TEKNIK PEMOTONGAN PROTEIN DENGAN METODE  
EDMAN SEBAGAI DASAR KERJA ANALISIS  
SEKUENSING**



**Oleh:  
Laurencius Sihotang  
8756130889**

**Program Studi Magister Pendidikan Biologi Angkatan 2013  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Jakarta  
2013**

## MACAM-MACAM TIPE PCR

Metode PCR saat ini sudah cukup canggih, namun PCR masih dapat dimodifikasi sehingga memberikan hasil yang lebih baik lagi. Teknik dasar PCR meliputi empat komponen utama yaitu:

1. Adanya DNA cetakan yaitu fragmen DNA yang akan diperbanyak.
2. Oligonukleotida primer, yaitu sekuen oligonukleotida pendek (15 – 25 basa nukleotida) yang
3. Digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA.
4. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP dan dTTP, sebagai bahan pensintesis molekul nukleotida.
5. Enzim DNA polymerase adalah enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA.

Berikut ini macam-macam tipe dan modifikasi dari PCR adalah sebagai berikut:

### ○ **Real-Time PCR**

Real-Time PCR adalah suatu metode analisa yang dikembangkan dari reaksi PCR. Real time ini juga dikenal sebagai *quantitative real time polymerase chain reaction* atau Q-PCR. Teknik ini dapat digunakan untuk mengamplifikasi sekaligus menghitung jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi tersebut. Pada analisa PCR konvensional, deteksi keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi dan pengamatan masih harus dilakukan dengan elektroforesis, namun analisa menggunakan Real-Time PCR memungkinkan untuk dilakukan pengamatan pada saat reaksi berlangsung. Pada Real Time PCR pengamatan hasil tidak lagi membutuhkan tahap elektroforensis, sehingga tidak lagi dibutuhkan gel agarose dan penggunaan Ethidium Bromide (EtBr) yang merupakan senyawa karsinogenik. Cara kerja dari Real Time mengikuti prinsip umum reaksi PCR, utamanya adalah DNA yang telah diamplifikasi dihitung setelah diakumulasikan dalam reaksi secara real time sesudah setiap siklus amplifikasi selesai.

### ○ **Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) merupakan metode yang digunakan untuk mengamplifikasi cDNA dari mRNA. RT-PCR digunakan untuk mendapatkan kembali dan menyalin utas 5' dan 3' dari mRNA, menghasilkan kumpulan cDNA yang banyak dari jumlah mRNA yang sangat sedikit. RT-PCR dapat dengan mudah digunakan untuk mengidentifikasi mutasi, polimorfisme dan mengukur kekuatan ekspresi gen. Konsep utama yang digaris bawahi pada teknik ini yaitu mengkonversi mRNA ke bentuk rantai tunggal untuk cetakan cDNA. Primer Oligodeoxynukleotida di hibridisasikan ke sehingga cDNA dapat teramplifikasi. Tergantung pada tujuan penelitian, primer untuk sintesis cDNA rantai pertama dapat disusun secara khusus untuk hibridisasi gen target atau dapat mengikat secara umum semua mRNA.

Teknik RT-PCR memerlukan enzim transcriptase balik (reverse transcriptase). Enzim transcriptase balik adalah enzim DNA polymerase yang menggunakan molekul RNA sebagai cetakan untuk mensintesis molekul DNA (cDNA) yang komplementer dengan molekul RNA tersebut. Beberapa enzim transcriptase balik yang dapat digunakan antara lain mesophilic viral reverse transcriptase (RTase) yang dikode oleh virus avian myoblastosis (AMV) maupun oleh virus moloney murine leukemia (M-MuLV), dan Tth DNA polymerase. RTase yang dikode oleh AMV maupun M-MuLV mampu mensintesis cDNA sampai sepanjang 10 kb, sedangkan Tth DNA polymerase mampu mensintesis cDNA sampai sepanjang 1 – 2 kb.

Berbeda dengan Tth DNA polymerase, enzim RTase AMV dan M-MuLV mempunyai aktivitas RNase H yang akan menyebabkan terjadinya degradasi RNA dalam hybrid RNA: cDNA. Aktivitas degradasi semacam ini akan berkurang jika berkompetisi dengan proses sintesis DNA selama proses produksi untai pertama cDNA. Enzim RTase yang berasal dari M-MuLV mempunyai aktivitas RNase H yang lebih rendah dibanding dengan yang berasal dari AMV.

Enzim M-MuLV mencapai aktivitas maksimum pada suhu 37°C sedangkan enzim AMV pada suhu 42°C dan Tth DNA polymerase mencapai aktivitas maksimum pada suhu 60 - 70°C. Penggunaan enzim M-MuLV kurang menguntungkan jika RNA yang digunakan sebagai cetakan mempunyai struktur sekunder yang ekstensif. Di lain pihak, penggunaan Tth DNA polymerase kurang menguntungkan jika ditinjau dari kebutuhan enzim ini terhadap ion Mn karena ion Mn dapat mempengaruhi ketepatan (fidelity) sintesis DNA. Meskipun demikian, enzim Tth DNA polymerase mempunyai keunggulan karena dapat digunakan untuk reaksi transkripsi balik sekaligus proses PCR dalam satu langkah reaksi.

Reaksi transkripsi balik dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa macam primer yaitu:

- a. Oligo (dT) sepanjang 12-18 nukleotida yang akan melekat pada ekor poli (A) pada ujung 3' mRNA mamalia. Primer semacam ini pada umumnya akan menghasilkan cDNA yang lengkap
- b. Heksanukleotida acak yang akan melekat pada cetakan mRNA yang komplementer pada bagian manapun. Primer semacam ini akan menghasilkan cDNA yang tidak lengkap (parsial).
- c. Urutan nukleotida spesifik yang dapat digunakan secara selektif untuk menyalin mRNA tertentu (Yuwono T 2006)

#### ○ **Nested PCR**

Nested PCR adalah suatu teknik perbanyakan (replikasi) sampel DNA menggunakan bantuan enzim DNA polymerase yang menggunakan dua pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen. Dengan menggunakan nested PCR, jika ada fragmen

yang salah diamplifikasi maka kemungkinan bagian tersebut diamplifikasi untuk kedua kalinya oleh primer yang kedua. Dengan demikian, nested PCR adalah PCR yang sangat spesifik dalam melakukan amplifikasi. Nested PCR dan PCR biasa berguna untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu dalam jumlah banyak. Dimana pada nested PCR digunakan 2 pasang primer sedangkan pada PCR biasa hanya menggunakan 1 pasang primer. Oleh karena itu hasil fragmen DNA dari nested PCR lebih spesifik (lebih pendek) dibandingkan dengan PCR biasa. Waktu yang diperlukan dalam reaksi nested PCR lebih lama dari pada PCR biasa karena pada nested PCR dilakukan 2 kali reaksi PCR sedangkan pada PCR biasa hanya 1 kali reaksi PCR. Selain itu, keuntungan nested PCR adalah meminimalkan kesalahan amplifikasi gendangan menggunakan 2 pasang primer. Mekanisme kerja dari nested PCR sendiri yakni pada Fase Denaturasi, Pertama-tama DNA mengalami denaturasi lalu memasuki fase penempelan. Fase Penempelan, sepasang primer pertama melekat di kedua utas tunggal DNA dan mengamplifikasi DNA di antara kedua primer tersebut dan terbentuklah produk PCR pertama. Fase pemanjangan, produk PCR pertama tersebut dijalankan pada proses PCR kedua di manapasaran primer kedua (nested primer) akan mengenali sekuen DNA spesifik yang berada di dalam fragmen produk PCR pertama dan memulai amplifikasi bagian di antara kedua primer tersebut. Hasilnya adalah sekuens DNA yang lebih pendek daripada sekuens DNA hasil PCR pertama.

Adanya perbedaan target DNA yang ingin diteliti serta pola fragmen yang berbeda menjadikan nested PCR ini banyak digunakan. Dengan adanya perbedaan seperti itu maka teknik nested PCR dikembangkan sesuai tujuan dan kegunaannya. Beberapa pengembangan teknik nested PCR adalah:

### **1. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)**

RAPD adalah teknik molekuler untuk mendeteksi keragaman DNA didasarkan pada penggandaan DNA. RAPD juga merupakan penanda DNA yang memanfaatkan primer acak oligonukleotida pendek (dekamer) untuk mengamplifikasi DNA genom organisme. Prinsip teknik RAPD didasarkan pada kemampuan primer menempel pada cetakan DNA. Primer yang didesain berupa primer tunggal pendek agar dapat menempel secara acak pada DNA genom organisme. Dengan demikian akan terdapat banyak pola fragmen DNA. Perbedaan ini dapat dilihat dengan adanya pola pita pada gel agarosa setelah diwarnai dengan pewarnaan DNA seperti etidium bromide. Disamping ditentukan oleh ada tidaknya situs penempelan primer, keberhasilan teknik ini ditentukan juga oleh kemurnian dan keutuhan DNA cetakan. DNA cetakan yang tidak murni akan mengganggu penempelan primer pada situsya dan akan menghambat aktifitas enzim polymerase DNA. Enzim ini berfungsi untuk melakukan polimerisasi DNA. Sedangkan DNA cetakan yang banyak mengalami fragmentasi dapat menghilangkan situs penempelan primer.

Keunggulan teknik RAPD terletak pada beberapa kemudahan sebagai berikut:

- a. Pengetahuan latar belakang genom organisme tidak diperlukan
- b. Hasil RAPD dapat diperoleh secara cepat terutama jika dibandingkan dengan analisis RFLP yang memerlukan banyak tahapan
- c. Beberapa jenis primer arbitrary dapat dibeli dan digunakan untuk analisis genom semua organisme

Kelemahan RAPD sebagai berikut:

- a. Pemunculan pita DNA kadang – kadang tidak konsisten. Hal ini lebih sering terjadi jika suhu annealing yang digunakan terlalu tinggi. Dalam analisis kekerabatan hal ini dapat diatasi dengan menggunakan primer yang lebih banyak.
- b. Ruas DNA yang berulang sering berlipat ganda (Talbert et al.1994)
- c. Homologi urutan nukleotida pada pita-pita DNA dengan mobilitas yang sama pada gel tidak diketahui
- d. Penanda RAPD bersifat dominan

## **2. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)**

AFLP merupakan teknik amplifikasi DNA yang segera dapat dilihat perbedaan fragmennya setelah PCR melalui gel agarose atau poliakrilamid. Teknik ini dapat digunakan untuk melihat adanya fragmen DNA yang berbeda karena adanya insersi ataupun delesi basa nukleotida dalam jumlah yang cukup besar. AFLP merupakan teknik yang lebih sensitive dari RAPD untuk menghasilkan polimorfisme antar genotip. AFLP banyak digunakan di antaranya untuk mendeteksi sifat-sifat yang berhubungan erat dengan lokus suatu karakter tertentu, sidik jari DNA, keragaman genetic, penelusuran pola segregasi penelusuran hasil mutasi, menetapkan jarak genetic dan mengidentifikasi keterpautan gen dengan resistensi penyakit. AFLP memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan RAPD antara lain amplifikasi DNA dapat bersifat spesifik dan lebih stabil. AFLP dapat digunakan untuk mengenali hubungan kekerabatan yang sangat dekat antar-genotip, perbedaan antar klon dalam satu kultivar, keragaman yang disebabkan terjadinya mutasi yang sangat sedikit, atau adanya perbedaan genetik yang sangat kecil.

Fragmen yang dihasilkan dari analisis AFLP yang tampak sebagai pita DNA diterjemahkan menjadi data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita yang dimiliki secara bersama oleh individu tanaman yang dianalisis. Nilai satu (1) diberikan untuk yang memiliki pita dan nilai nol (0) untuk yang tidak memiliki pita.

### 3. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP merupakan teknik PCR yang menggunakan enzim restriksi untuk mendeteksi keragaman DNA. Amplikon dipotong dengan menggunakan enzim restriksi untuk mendapatkan fragmen DNA. Enzim restriksi yang umumnya digunakan yaitu enzim yang biasanya ditemukan pada organisme prokariotik. Organisme yang menghasilkan enzim restriksi endonuklease mampu melindungi genomnya sendiri dari metilasi nuklotida di dalam sekuen endonuklease yang dikenali. Secara umum ada dua macam tipe enzim restriksi yaitu:

- a. Enzim yang mengenali sekuen spesifik tetapi memotong di beberapa tempat
- b. Enzim yang memotong hanya pada situs yang dikenali

Tipe enzim yang kedua yaitu enzim yang sangat penting. Umumnya sekuen potongannya diketahui. Biasanya panjangnya enzim restriksi ini 4 sampai 6 nukleotida. Enzim pada kelompok ini membuat bentuk potongan yang berbeda yaitu:

- a. Bentuk potongan yang lancip
- b. Bentuk potongan yang tumpul

Sangat penting untuk mengenali enzim pemotong ini karena bersifat sangat spesifik dalam memotong sekuen nukleotida yang dikenalnya. Parameter yang perlu diperhatikan dalam menggunakan teknik ini yaitu:

#### 1. Kemurnian DNA

Secara umum enzim restriksi sangat efisien dalam memotong situs DNA namun tergantung pada kemurnian DNA. Adanya kontaminasi seperti protein lain, fenol, kloroform, etanol, EDTA, SDS, konsentrasi garam yang tinggi dapat menjadi penghambat reaksi enzim restriksi.

#### 2. Buffer enzim restriksi

Untuk tiap-tiap enzim restriksi dibuat kondisi reaksi yang optimal oleh pabrik pembuat enzim.

#### 3. Faktor lain

Jumlah yang besar kadang-kadang diperlukan untuk memotong DNA sirkular pada plasmid atau DNA virus dibandingkan untuk memotong DNA linier

### 4. Single strand conformation polymorphism (SSCP)

Single strand conformation polymorphism merupakan salah satu teknik PCR yang dapat mendeteksi perbedaan nukleotida dari DNA produk PCR dengan perbedaan satu nukleotida. Metode ini memanfaatkan perbedaan laju migrasi utas tunggal DNA setelah didenaturasi dalam formamide dye dan perlakuan panas pada gel poliakrilamid yang diikuti dengan pewarnaan perak.

Gerakan pita ganda DNA pada gel elektroforesis pada umumnya tergantung pada ukuran dan panjang basa. Sedangkan gerakan pita tunggal

sangat jelas dipengaruhi oleh perubahan yang sangat kecil dalam sekuen. Perubahan yang sangat kecil jelas terjadi karena secara alami pita tunggal tidak stabil. Dengan demikian dapat terjadi lekukan karena ada atau tidak adanya pita pasangannya yang menyebabkan pasangan basa terletak diantara pita dan menghasilkan struktur pita 3D yang unik. Perubahan satu nukleotida berpengaruh terhadap gerakan dalam gel elektroforesis. Untuk mendapatkan pita tunggal, amplikon dipanaskan pada suhu tinggi dan kemudian didinginkan secara mendadak. Pita tunggal yang diperoleh dirunning pada gel poliakrilamid.

- **Multiplex-PCR**

Multiplex PCR merupakan beberapa set primer dalam campuran PCR tunggal untuk menghasilkan amplikon dari berbagai ukuran yang spesifik untuk sekuens DNA yang berbeda. Dengan penargetan gen sekaligus, informasi tambahan dapat diperoleh dari lari-tes tunggal yang tidak akan membutuhkan beberapa kali reagen dan lebih banyak waktu untuk melakukan. Temperatur Annealing untuk masing-masing set primer harus dioptimalkan untuk bekerja dengan benar dalam reaksi tunggal, dan ukuran amplikon. Artinya, panjangnya pasangan basa harus berbeda cukup untuk membentuk band yang berbeda ketika divisualisasikan dengan elektroforesis gel

- **PCR-ELISA**

PCR-ELISA merupakan metode yang digunakan untuk menangkap asam nukleat yang meniru prinsip dari enzim linked immunosorbant yang terkait. Dimana dalam sebuah pengujian hibridisasi hasil produk dari PCR akan terdeteksi dengan metode ini. Dengan metode inilah dapat dilakukan pengukuran sekuen internal pada produk PCR. Metode ini lebih dipilih karena lebih murah dibandingkan metode Real Time PCR. PCR-ELISA telah digunakan sejak akhir 1980-an dan telah berkembang untuk mendeteksi sekuen tertentu dalam produk PCR. Meskipun banyak metode yang tersedia untuk mendeteksi sekuen tersebut, ELISA PCR berguna untuk mendeteksi dan membedakan antara beberapa sasaran dari sekuen yang diinginkan. ELISA PCR ini juga berguna untuk screening beberapa sampel, terutama bila jumlah sampel tidak menjamin. Salah satu aspek yang paling berguna dari PCR-ELISA adalah kemampuannya dalam membedakan antara produk reaksi perubahan polimerase yang dihasilkan dari seperangkat primer yang mengandung variasi sekuen, yaitu sekuen yang bervariasi antar primer.

- **Touchdown PCR**

Sebuah modifikasi dari PCR yang mencegah amplifikasi sekuens nonspesifik dengan memainkan suhu annealing. sebuah varian dari PCR yang bertujuan untuk mengurangi latar belakang spesifik secara bertahap menurunkan suhu anil sebagai bersepeda PCR berlangsung. Suhu anil pada awal siklus biasanya beberapa derajat (3-5 ° C) di atas m T primer yang digunakan, sedangkan pada siklus kemudian, ini adalah beberapa derajat (3-5°C) di bawah T primer m. Suhu tinggi memberikan spesifisitas yang

lebih besar untuk primer mengikat, dan suhu yang lebih rendah izin lebih amplifikasi efisien dari produk tertentu terbentuk selama siklus awal.

Masih banyak jenis modifikasi dari PCR ini, seperti :

- Allele-specific PCR
- Assembly PCR
- Assymetric PCR
- Dial-out PCR
- Hot start PCR, dan lainnya.

## **TEKNIK PEMOTONGAN PROTEIN DENGAN METODE EDMAN SEBAGAI DASAR KERJA ANALISIS SEKUENSING**

Sekuensing protein atau sekuensing peptida adalah penentuan urutan asam amino pada suatu protein atau peptida (oligopeptida maupun polipeptida). Metode untuk sekuensing protein umumnya melibatkan pemutusan ikatan yang diikuti dengan identifikasi asam amino.

Pada metode degradasi Edman, residu pada ujung-N (ujung amino) protein dipotong satu per satu dengan reaksi kimia. Setelah setiap pemotongan, residu asam amino yang telah dipotong tersebut dapat diidentifikasi menggunakan kromatografi. Prosedur tersebut diulangi untuk setiap residu asam amino. Kelemahan metode ini adalah bahwa polipeptida yang di-sekuensing tidak dapat lebih panjang dari 50–60 residu (dapat disiasati dengan memotong-motong polipeptida berukuran besar menjadi peptida-peptida berukuran lebih kecil sebelum dilakukan reaksi).

Metode sekuensing protein yang lain memanfaatkan spektrometri massa yang mampu mengukur massa peptida dengan tepat. Protein yang hendak di-sekuensing dipotong-potong secara enzimatis maupun kimia menjadi peptida-peptida yang kemudian dianalisis menggunakan spektrometri massa. Dalam proses spektrometri massa, peptida-peptida tersebut dipecah secara ionisasi, misalnya dengan bantuan laser pada metode matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight spectrometry (spektrometri "ionisasi desorpsi laser dengan bantuan matriks"- "waktu terbang"/MALDI-TOF), kemudian ion-ion residu yang dihasilkan ditentukan massanya. Pada metode peptide mass fingerprinting ("penyidikjarian massa peptida"), data massa fragmen-fragmen peptida tersebut dianalisis secara bioinformatika dengan rujukan basis data besar asam nukleat untuk menentukan sekuens protein asalnya (secara statistika berdasarkan data asam nukleat pada basis data tersebut). Selain itu, sekuens

protein juga dapat ditentukan langsung dengan spektrometri massa pada metode tandem mass spectrometry ("spektrometri massa tandem").

Jika gen penyandi suatu protein dapat diidentifikasi, saat ini jauh lebih mudah melakukan sekuensing DNA dari gen tersebut dan menentukan sekuens proteinnya dari sekuens DNA itu dibandingkan dengan harus melakukan sekuensing terhadap protein itu sendiri. Sebaliknya, penentuan sebagian sekuens asam amino suatu protein (biasanya dari salah satu ujung rantai proteinnya) dapat memungkinkan identifikasi klon pembawa gen tersebut.

#### Daftar Acuan

1. [kimia-campur.blogspot.com/2010/06/sekuensing.html](http://kimia-campur.blogspot.com/2010/06/sekuensing.html)
2. <http://blogs.uajy.ac.id/bihungoreng/2013/05/26/polymerase-chain-reaction/>
3. <http://nur-khabibah.blogspot.com/2009/05/beberapa-tipe-teknik-pcr.html>
4. <http://id.scribd.com/doc/95531151/PCR>
5. <http://id.wikipedia.org/wiki/Sekuensing>